Dott. GAETANO BOMPIANI

ASSIST. NELL'IST. DI ANATOMIA PATOLOGICA

NELLA REGIA UNIVERSITÀ DI ROMA ◇ ◇

ESPERIENZE E RISULTATI OTTENUTI DALLA COLTURA DEI TESSUTI "IN VITRO"

Estratto dalla *Rivista di Biologia*, Vol. II, fasc. I

Roma, 1920 - Tipografia
del Senato di G. Bardi.

RIVISTA DI BIOLOGIA

PUBBLICAZIONE BIMESTRALE

DIRETTORI:

GUSTAVO BRUNELLI - OSVALDO POLIMANTI

Sommario del Fascicolo I, Volume II

(Gennaio-Febbraio 1920).

La Corrispondenza dei collaboratori dovrà essere indirizzata impersonalmente alla "Rivista di Biologia" *Via della Dogana Vecchia, 27 - Roma.*

Redattore capo: Dott. Vincenzo Rivera.

ABBONAMENTI

Italia e Colonie: Un anno L. **40** - Sei mesi L. **20**

Estero: . . . Un anno Frs. **50** - £ **2** - $ **10**
Sei mesi Frs. **25** - £ **1** - $ **5**

Dirigere vaglia alla Tipografia del Senato del Dr. Giovanni Bardi, editore - Roma. - Per le inserzioni rivolgersi alla "Agenzia del Policlinico" Fratelli Fiocchi - *Piazza Venezia (angolo Via Giulio Romano, Lett. A) - Roma.*

Dott. GAETANO BOMPIANI

ASSIST. NELL'IST. DI ANATOMIA PATOLOGICA
NELLA REGIA UNIVERSITÀ DI ROMA ◇ ◇

ESPERIENZE E RISULTATI OTTENUTI DALLA COLTURA DEI TESSUTI "IN VITRO"

Estratto dalla *Rivista di Biologia*, Vol. II, fasc. I

Roma, 1920 - Tipografia
del Senato di G. Bardi.

Esperienze e risultati ottenuti dalla coltura dei tessuti in « vitro ». — Il metodo della coltura dei tessuti in vitro ha permesso essenzialmente, secondo il Levi, di seguire sotto il microscopio le manifestazioni biologiche di elementi cellulari dissociati, provenienti da organismi pluricellulari, mantenendoli a lungo in vita e permettendo anche la moltiplicazione di alcuni di quegli elementi: tale mezzo la scienza non possedeva, prima delle esperienze, coronate da buon successo, dell'Harrison. Questi riuscì (1907) (Yale - Università) a mantenere in vita e ad osservare fenomeni di accrescimento in frammenti di embrioni di rane (tubo neurale, compresi i miotomi e il mesenchima circostanti. e il tratto di pelle soprastante) coltivati in linfa coagulata dell'animale adulto.

Il Burrows (1910) sostituì con vantaggio alla linfa il plasma di sangue coagulato, e coltivò il sistema nervoso di embrione di pollo nel plasma del pollo adulto.

Carrel e Burrows passarono dalla coltivazione dei tessuti embrionali, a quella dei tessuti adulti; intermedio è l'impiego dei neonati. Gli stessi AA. applicarono per primi il metodo alla coltivazione dei tumori, sperimentando prima col sarcoma di Rous del pollo e poi col sarcoma dell'uomo. Il Centanni, pertanto, rammenta che già prima, fra noi, il Volpino aveva avuto buoni cenni, per la coltura dei tumori, mettendo a 37°, in siero solidificato di cavallo, frammenti di carcinoma di topo.

Le osservazioni e gli studi attuati con questo nuovo metodo di indagine, ben presto si moltiplicarono in tutti i paesi, e molti altri contributi furono portati dalle ulteriori ricerche del Carrel stesso. Notevoli, i lavori di Lambert e Hanes come contributi sistematici alle questioni istologiche attinenti alla coltivazione dei tessuti in genere e dei tumori in ispecie.

I.

Comportamento dei tessuti e degli organi nelle colture in vitro.

Pelle. — Già nelle primissime esperienze di coltura dei tessuti in vitro, Harrison osservò nel frammento di cute, rivestente il tratto di tubo neurale di rana messo in coltura, un migrare e moltiplicarsi degli elementi epiteliali dei margini. Tale accrescimento avviene secondo un tipo, definito da Lambert e Hanes, come di accrescimento «a tipo epiteliale» per contrapporlo a quello «a tipo connettivale»; i due tipi rappresentano come i due paradigmi secondo i quali si verifica l'accrescimento dei tessuti coltivati in vitro. Il tipo di accrescimento epiteliale è contraddistinto, essenzialmente, dall'avanzarsi degli elementi neoformati, non isolatamente come avviene nell'accrescimento di tipo connettivale, ma riuniti piuttosto in un sincizio citoplasmatico con nuclei assai numerosi distributivi, in cui non si riesce a distinguere i limiti delle cellule, e che avanza a mezzo di pseudopodi come uno strato assai sottile nel plasma ambiente circostante (vegetazione a strato continuo). Subito dietro l'orlo ialino di citoplasma che si avanza, si nota un accumulo di cellule. Talora gruppi di cellule epiteliali si distaccano dall'ampio strato descritto e si avanzano nel plasma, ma mai, o quasi mai, come cellule isolate.

Presentano il tipo d'accrescimento epiteliale: la pelle, la tiroide e l'intestino; accrescimento a tipo connettivale (a cellule isolate o a cordoni formanti spesso un reticolo): la milza, il midollo delle ossa, i vasi sanguigni. Le colture del cuore e del fegato presentano solo l'accrescimento a tipo connettivale.

Le cellule parenchimatose di organi specializzati come il pancreas, il fegato e i reni mostrano soltanto accenni di accrescimento.

Talora l'accrescimento dell'elemento connettivale sopraffà quello della parte epiteliale; per esempio ciò accade nelle colture della pelle di cavia. Invece nella pelle di rana adulta la coltura dà quasi esclusivamente cellule epiteliali.

Con il metodo delle colture fu potuto eseguire il processo di cicatrizzazione delle ferite in vitro (Ruth, con la cute di rana). Si vide che dapprima si ha uno scivolamento dell'epitelio dai margini della ferita verso la soluzione di continuo; poi un moltiplicarsi degli elementi epiteliali per colmare il vuoto; infine la retrazione degli antichi margini, la quale fa sì che lo spazio da colmare sia ridotto anche a meno di un quarto della superficie del vuoto aperto: fenomeno della retrazione osservato da Carrel anche nella cicatrizzazione delle ferite «in vivo».

Due frammenti di cute posti alla distanza di mm. 0.3 presto si riuniscono con un ponte epiteliale.

La velocità della vegetazione epiteliale è di circa mm. 0.06 di avanzamento per ora, e una ferita di mm. 0.82 × 0.32 può essere completamente coperta dopo 10 ore di coltura.

La proliferazione dei tessuti epiteliali non si osserva, nelle colture, in misura notevole che nella cute di animali neonati o di embrioni, mentre nei tessuti adulti normali soltanto gli elementi connettivali sono capaci di sopravvivere a lungo e di proliferare in vitro: nei tumori invece, la parte connettivale e la epiteliale sono capaci di conservarsi entrambe in vita e di proliferare attivamente.

Tessuto connettivo. — Le osservazioni concernenti lo sviluppo del connettivo in vitro, sono, per le ragioni suesposte, le più numerose. Carrel e Burrows seguirono le colture sia di formazioni connettivali, come le sierose pericardica e peritoneale e le pareti vasali, – sia del connettivo interstiziale che si sviluppa sopraffacendo il parenchima di organi diversi, come il cuore, la milza, la pelle. Il connettivo di nuova produzione ha carattere embrionale: gli elementi neoformati prendono origine da quelli situati alla periferia del frammento innestato che sopravvivono (« zona fertile » di Champy), mentre (come in ogni coltura dei tessuti) quelli della parte centrale cadono in necrosi; da detta zona si irradiano poi, avanzandosi, per proliferazione e per movimenti ameboidi, nel materiale di coltura, e costituiscono una formazione reticolata di cellule fusiformi o stellate attorno al pezzo primitivo (« zona di invasione » di Champy).

Secondo gli studi di Veratti si distinguono, di norma, tra gli elementi di natura connettivale che si originano nella coltura dei tessuti in vitro, due sorta di cellule: « fibroblasti ramificati e anatomizzati fra loro a costituire una formazione reticolata; e fagociti, mobili, migranti liberamente nel tessuto e nel materiale di coltura ». I fagociti, secondo le osservazioni del Veratti stesso, originano « da quel gruppo di elementi dei connettivi normali, che si sogliono ora riunire sotto il nome generico di istiociti e che in passato erano indicati con diverse denominazioni: macrofagi, cellule avventiziali, cellule migranti, clasmatociti, cellule ragiocrine, cellule plasmatiche, ecc., a seconda delle condizioni speciali e della fase funzionale, od evolutiva, nella quale erano stati osservati ».

La genesi di questi elementi – fibroblasti e fagociti – è stata dal Veratti perseguita nei tessuti in coltura di animale adulto e propriamente nel polmone, nel cervello, nel rene, nel fegato e nella milza del coniglio.

Secondo il detto autore, soltanto queste due categorie di cellule – fibroblasti e fagociti – sopravvivono (e si moltiplicano) agli elementi parenchimatosi specifici degli organi in coltura. I fibroblasti si riconoscono

per presentare le caratteristiche tutte dei fibroblasti giovani: elementi fusiformi o stellati crescenti liberamente nel plasma, – e anastomizzantisi fra loro, – con nucleo vescicolare ben colorabile, con uno o due nucleoli, e protoplasma finamente striato, talvolta con piccoli vacuoli; spesso sono presenti figure cariocinetiche perfettamente normali.

I fagociti invece presentano un ampio corpo protoplasmatico, di forma rotondeggiante, e nucleo piccolo, rotondo, di solito centrale, intensamente colorato. Questi elementi si vedeno, sia nella parte periferica del pezzo seminato, sia fra le maglie della rete dei fibroblasti proliferati, sia, infine, come singoli elementi a distanza anche notevole dal pezzo innestato, nel materiale di coltura. Nelle colture di cervello riuscì al Veratti di colpire varie forme e stadi di passaggio tra questi elementi e le cellule avventiziali dei vasi (capillari e piccole vene) che in quest'organo sopravvivono più a lungo che negli altri organi e perciò meglio si prestano alla dimostrazione. Da tale reperto l'A. induce l'origine dei fagociti nelle colture di cervello dalle cellule avventiziali dei vasi.

Per la somiglianza morfologica e funzionale tra questi fagociti del cervello e i fagociti del polmone o di altri organi, il Veratti esprime, come naturale e spontanea, l'ipotesi che anche questi ultimi siano di derivazione avventiziale, e che solo per le meno favorevoli condizioni di osservazione, tale derivazione non possa ossere sorpresa in atto come nel cervello.

Proprietà comuni dei fagociti nelle colture sono, oltre all'attività fagocitaria, quella di elementi migranti e dotati di attività ameboide.

Un'interessante esperienza di Levaditi e Muttermilch tenderebbe a dimostrare (secondo gli AA.) una diversità di capacità di accrescimento del connettivo a seconda dell'organo da cui proviene: essi videro che un'esposizione ai raggi ultravioletti per 20–30 minuti toglie la vegetabilità alle colture del connettivo proveniente dal cuore, e non a quelle della milza.

Dei tessuti connettivi differenziati, il cartilagineo, sebbene cresca con lentezza, avrebbe fornito, anzi, a Champy l'unico esempio di un tessuto che raggiunge uno stadio di differenziazione notevole (le cellule neoformate si cingono di capsula e di sostanza intercellulare) tra tutti i tessuti dal detto A. coltivati « in vitro ».

Sulla capacità di sopravvivere e di moltiplicarsi nelle colture degli altri elementi cellulari, di natura non connettivale, vi sono disparità di apprezzamenti da parte dei diversi osservatori e differenze di comportamento a seconda che trattisi di organi di animali adulti o di embrioni

Tessuti muscolari. — Per ciò che riguarda il tessuto muscolare, Harrison potè seguire i miotomi aderenti al tubo neurale di embrione di rana, messo in coltura, differenziarsi in fibre striate.

Burrows coltivò frammenti di cuore di embrione di pollo nello stadio precoce, quando non è avvenuta la differenziazione, e vide che « le cellule segmentate e differenziate cominciano a pulsare come il cuore sviluppato dell'embrione intero. Se si impiegano frammenti di cuore differenziati, di embrione più adulto, 14 giorni, non pulsa il frammento innestato, ma la pulsazione si manifesta nelle nuove cellule migrate dal frammento e differenziatesi ». L'A. ne trae argomento a favore della dottrina miogena della contrazione cardiaca.

Nelle colture del cuore, più che la moltiplicazione, gli AA. hanno potuto osservare la capacità di quel tessuto di conservarsi pulsante. Carrel e Burrows videro tale proprietà, dapprima spegnersi dopo 3–8 giorni; ma poi con il trattamento del ringiovanimento delle colture – lavaggio in siero e rinnovamento del plasma – hanno potuto protrarla per una serie di 35 passaggi e per 104 giorni. Il connettivo tendeva a sopraffare con il suo sviluppo la parte muscolare, e perchè questa non ne rimanesse soffocata si doveva, ad ogni trapianto, liberarla dalla crosta connettivale. Carrel sarebbe riuscito a conservare le pulsazioni quasi per un anno. Interessante l'osservazione che due frammenti di cuore di embrione di pollo che pulsavano con un ritmo differente (120 e 160), messi in coltura l'uno vicino all'altro, dopo otto ore si congiunsero mediante un ponte connettivale e i battiti divennero sincroni.

Tessuti nervosi. — Le osservazioni concernenti la coltura in vitro del tessuto nervoso sono numerose e portate su tessuti embrionali ed adulti. Harrison constatò l'emissione di fibre nervose dalle cellule del tubo neurale di rana, al primo abbozzo embrionale, e Burrows in frammenti di embrioni di pollo coltivati in vitro. I filamenti che si inoltravano per un tratto abbastanza lungo nel plasma, terminavano con espansioni ameboidi: per le proprietà morfologiche e tintoriali specifiche tali filamenti sono da considerarsi veri cilindrassi, partenti dalla cellula di origine, e costituiti da neurofibrille riunite in fasci. Si vide (Ingebrigtsen) (cit. da Centanni) che, separando col taglio detti filamenti, la parte separata dalla cellula d'origine cade in necrosi: però dopo venti ore nel punto del taglio si è formato un nuovo cilindrasse. Questi reperti sono stati addotti a favore della teoria dei neuroni.

In tutti i tessuti nervosi embrionali gli AA. (Legendre e Minot, Marinesco e Minea, Drew, Shorey, Lewis, Levaditi, Ingebrigtsen, Centanni e Ugurgieri, G. Levi) sono concordi nell'ammettere la sopravvivenza delle cellule del cervello, cervelletto, midollo, gangli spinali e simpatici, e la loro capacità di emettere nuovi prolungamenti nervosi nel materiale di coltura, mentre non hanno potuto dimostrare una moltiplicazione delle cellule stesse.

Ingebrigtsen ha ottenuto reperti analoghi in colture di cervelletto di gatti e cavie giovani.

Invece al Veratti (I) non è riuscito di dimostrare traccia di fibrille nervose emergenti alla periferia dei pezzi di cervello di coniglio adulto, innestati, ed ha sempre riscontrato la necrosi degli elementi nervosi e della nevroglia come pure di tutti gli elementi nervosi del pezzo innestato, dopo un tempo variabile da uno a sette giorni. Relativamente conservati sono i capillari, che si trovano nel frammento di tessuto in necrosi, e il connettivo delle meningi. Da questi elementi prendono origine le cellule che, sole, sopravvivono e si moltiplicano – secondo il Veratti – nei tessuti nervosi in coltura, cioè i fibroblasti e i fagociti; questi ultimi provenienti dalle cellule perivasali, mobilitatesi durante il periodo della coltura.

Riassumendo, nei tentativi fatti con i tessuti nervosi, di « coltivarli » secondo la tecnica di Harrison, Burrows e Carrell in plasma coagulato, non si sono osservati fenomeni di moltiplicazione degli elementi specifici innestati, ma, nei casi più favorevoli (materiale embrionario), soltanto fenomeni di sopravvivenza.

Organi ematici. — Per ciò che riguarda gli organi ematici sono state ricordate alcune esperienze concernenti la coltura di frammenti di miocardio a proposito dei tessuti muscolari. Delle pareti arteriose e venose furono tentate le colture con la tecnica usuale, da Carrel e Burrows, con risultato di un accrescimento « a tipo connettivale ». Lambert e Hanes hanno anch'essi mantenuto una coltura di carotide di ratto per settantotto giorni rilevando la presenza di mitosi fino agli ultimi passaggi. I vasi arteriosi e venosi parenchimali si mantengono più o meno a lungo sopravviventi, in coltura, a seconda degli organi a cui appartengono: così, dagli studi del Veratti, risulta che si conservano molto più a lungo i vasi della milza e del cervello, che quelli del rene, del fegato e del polmone. Questo A. fa notare incidentalmente la scarsa resistenza alla vita in coltura degli elementi del sangue: in sezioni di piccole vene di frammenti di milza coltivati, i globuli bianchi e i rossi appaiono digregati, mentre le pareti dei vasi sono ancora ben conservate. La questione della neoformazione vasale propriamente detta « in vitro », per mezzo di cellule vasoformatrici, è stata affrontata con apposite ricerche dal Loeb, il quale ha concluso che nelle colture di tessuti non avviene mai neoformazione di vasi nel materale di coltura, anche quando i vasi rimangono in vita nel tessuto. L'A. propende a credere che ciò possa esser dovuto alla mancanza della pressione sanguigna (cit. da Veratti) (1).

La milza è stato uno degli organi più di frequente usato nelle ricerche sulle culture dei tessuti in vitro. Tanto in questo organo, come nel midollo delle ossa e nei gangli linfatici gli AA. (Carrel e Burrows, Ingebrigsten, Foot) sono concordi nel rilevare la vivace attività migra-

toria e proliferativa, che aumenterebbe fino al terzo giorno, per spegnersi verso il quinto; si distinguono leucociti, cellule ameboidi granulose grandi, e poche cellule fusiformi. Il Veratti che ha studiato le colture di milza di coniglio adulto, iniettato prima nelle vene con soluzione di litiocarminio, rileva, fra le maglie del reticolo fatto dai fibroblasti neoformati, la presenza di cellule grandi, tondeggianti, con protoplasma abbondante carico di granulazioni rosse: queste cellule corrispondono a quelle che, col metodo della colorazione vitale, già furono descritte da diversi autori con il nome di splenociti: sono normalmente, come nelle colture, cellule a funzione fagocitaria, che, quando nella milza si accentua il processo di distruzione dei globuli rossi, si presentano coll'aspetto delle cellule globulifere e pigmentifere.

Così anche nella milza (di animale adulto) secondo il Veratti, vanno incontro alla necrosi tutti gli elementi di più alto grado di differenziazione; tra gli elementi della polpa sopravvivono soltanto gli splenociti, che restano liberi e migrano nel tessuto e nel materiale di coltura, come cellule fagocitarie; secondo il Veratti però « gli splenociti più che un vero componente della polpa splenica, sono da considerarsi parte integrante di quel tessuto connettivo modificato, che costituisce lo stroma di sostegno dell'organo, ed alberga nelle sue maglie gli elementi propri della polpa ».

Oltre ai fagociti sopravvivono nelle colture della milza le cellule del reticolo che si comportano come fibroblasti costituendo un sincizio. Anche in quest'organo dunque, in stato di sopravvivenza, « riescono ad esser poste in evidenza le due categorie di cellule, che entrano nella costituzione di tutti i tessuti connettivi, i fibroblasti e gli istiociti ». (Veratti).

Colture di gh. linfatiche furono tentate da V. Sebastiani, di un leucemico, in rapporto all'influenza di varî plasmi umani: notò nessuna azione stimolante da parte del plasma del leucemico, azione inibente sullo sviluppo da parte di un plasma di sifilitico.

Organi ghiandolari. — Tra gli organi ghiandolari furono coltivati il rene, il fegato, l'ovaio, il testicolo, la tiroide, la parotide, la sottomascellare; inoltre il polmone e la placenta.

Nelle colture di questi organi è difficile stabilire quanto debba interpretarsi di natura connettivale e quanto di origine parenchimale (Hadda): a ogni modo l'elemento connettivale prende sempre il sopravvento, se non costituisce tutto il tessuto di neoformazione. Secondo Champy le cellule ghiandolari si moltiplicherebbero realmente, ma dando origine soltanto a elementi di tipo indifferente. Nel testicolo e nell'ovaio le cellule giovani provenienti dalle cellule germinali, riuscirebbero a distinguersi tuttavia da quelle di derivazione dello stroma. Nelle colture

del rene di gatto e della tiroide di gatto e di cane, Carrel e Burrows, Valton, Loeb, Moore e Fleischer, sarebbero riusciti a vedere distinti abbozzi tubulari.

***

Tali, brevemente riassunti, i risultati principali delle osservazioni delle colture « in vitro » di tessuti e organi embrionali ed adulti.

Tali ricerche hanno dato occasione ad alcune considerazioni di interesse biologico generale, che il Levi (1) riassume in tre punti, che qui riferiremo in succinto:

1° Nelle colture i frammenti di tessuto innestati non riproducono mai la struttura dell'organo e del tessuto normale, anche quando ne conservino le proprietà morfologiche e funzionali specifiche. Questo accrescimento disordinato è dovuto alle condizioni abnormi di vita cui sottostà la massa cellulare in coltura, e forse a mancate influenze del resto dell'organismo da cui è separata. Tale influsso ci dà forse ragione dell'accrescimento quasi ordinato ad un fine - che è quello di riprodurre la parte distrutta talora con mirabile perfezione anatomica, - quale si verifica appunto nei fenomeni di rigenerazione, che per tal fatto si differenziano nettamente dai fenomeni che si osservano nelle colture in vitro.

2° Un secondo fatto che sorprende nelle colture dei tessuti in vitro, è la capacità che questi acquistano di moltiplicarsi all'infinito, come le cellule degli apici vegetativi delle piante, e gli elementi dei tumori maligni.

Se gli stessi elementi non fossero stati distaccati dall'organismo, l'accrescimento loro si sarebbe arrestato, dopo un determinato periodo di sviluppo, quando l'organo avesse raggiunto la sua grandezza definitiva.

Isolati hanno invece mantenuto tutta l'attività di accrescrimento originaria, anzi questa tendeva ad aumentare ad ogni nuovo trapianto.

Questi fatti starebbero a dimostrare che « la limitazione dell'accrescimento degli organismi animali non dipende da fattori insiti alle cellule, ma dalle stesse cause che regolano la forma e la struttura degli organi »; possiamo sospettare che in ciò abbiano importanza « i rapporti vicendevoli fra i varî tessuti ed organi, e più ancora forse le sostanze stimolanti od ormoni circolanti, le quali stabiliscono le correlazioni nell'accrescimento dei varî organi » (Levi, lav. citato).

3° Alcuni risultati delle colture dei tessuti ci confermano ancora dell'esattezza della dottrina cellulare, quale fu enunciata da Schwan e da Virchow. Infatti, se l'individualità morfologica e funzionale di certi elementi sembra distrutta, in quanto organismi elementari, quando si

trovino riuniti in sincizio o da filamenti plasmatici e da fibrille, essa invece riappare integra quando esse acquistano, nelle colture, una indipendenza che non possedevano nel tessuto, e gli elementi isolati si dimostrino capaci delle funzioni specifiche che possedeva il sincizio. Così le cellule isolate del cuore pulsano nelle colture, come il miocardio intero, dando la dimostrazione che la costituzione sinciziale di questo non è condizione necessaria per la sua funzione specifica.

Dunque anche nelle strutture sinciziali il nucleo continua a esercitare un'influenza regolatrice sovra una zona di protoplasma di grandezza molto costante, che ha, in potenza, la capacità di separarsi, – in condizioni di vita particolari – quale organismo elementare autonomo, dal resto del sincizio, col nucleo che le appartiene.

II.

Processi biologici generali investigati con la coltura dei tessuti.

Le stesse ricerche hanno offerto contemporaneamente l'opportunità di studiare questioni di fine citologia, di istologia normale e patologica, di fisiologia e patologia cellulare.

Basterà accennare ad alcuni di questi studi. G. Levi (2) e (3) si è valso affatto recentemente del metodo della coltura «in vitro», delle cellule viventi per indagini sulla costituzione fisica del protoplasma e per lo studio approfondito dei condriosomi.

Lambert e Hanes portano notevoli contributi a molte questioni generali.

Per ciò che riguarda lo studio della *cariocinesi*, e della *divisione cellulure* in generale. questi AA. osservarono, nelle colture, sempre divisioni per cariocinesi, e solo in colture di tumori e di midollo osseo, accenni a divisione amitotica per gemmazione nucleare; la durata del processo di divisione cellulare, osservato al microscopio in camera riscaldata, varia a seconda della temperatura e della specie animale: così le cellule connettivali del gatto si dividono, a 37° C, in 15–30 minuti, quelle del ratto in 25–45 minuti; la maggior parte del tempo viene impiegata nella formazione della piastra equatoriale, mentre, dopo l'allontanamento reciproco delle masse dei cromosomi figli, la divisione del citoplasma avviene rapidamente.

Lambert e Hanes hanno anche studiato da vicino le *granulazioni* che compaiono nelle cellule, coltivate in vitro. In esse si accumulano rapidamente gocciole di grasso rifrangenti, isotrope e colorantisi a fresco con il Sudan III. Esse si trovano alla periferia della cellula. Nei preparati fissati e colorati col metodo di Altmann si mettono in evidenza

nella parte centrale perinucleare del protoplasma, fino a quel momento provvista di gocciole di grasso, le granulazioni cellulari (di Altmann), con disposizione assai somigliante a quella delle gocce di grasso, periferiche. Gli AA. dicono che non ci si può sottrarre all'impressione che le «granulazioni cellulari» siano i precursori delle gocciole di grasso. Questa ipotesi della «sintesi granulare del grasso» fu enunciata prima dallo stesso Altmann, e riceveva notevole sostegno dai lavori di J. Arnold e Goldmann. Questi vide nei tessuti flogistici tubercolari e di altra natura, colorati vitalmente, che le cellule di tanto s'impoverivano di «granulazioni cellulari» di quanto s'arricchivano di gocciole di grasso. Però, neppure con ciò vien data la dimostrazione diretta della trasformazione delle granulazioni cellulari in gocciole di grasso (e anzi Goldmann non era incline a spiegare i suoi reperti come una dimostrazione della «sintesi granulare dei grassi»); e nelle colture – affermano L. e H. – «è impossibile di seguire il processo di trasformazione delle granulazioni cellulari in granuli di grasso attraverso gli stadi intermedi». Gli AA. però si ripromettono buoni risultati in questo campo, dalla coltura dei tessuti (V. A. pag. 101, vol. 211).

L'accumularsi delle gocce di grasso nelle cellule dei tessuti coltivati non è da interpretarsi, secondo L. e H., come un fenomeno degenerativo, ma è forse l'espressione di una intensa attività anabolica della cellula. Infatti cellule piene di gocciole di grasso presentano vivaci movimenti ameboidi e figure cariocinetiche che non si accordano con l'interpretazione di uno stato degenerativo della cellula. Gli AA. poi concludono che l'accumularsi del grasso nelle cellule coltivate in vitro rappresenti un indebolimento della funzione catabolica della cellula e che qui, come nelle cellule corporee, significhi infiltrazione, e non degenerazione.

Accanto alle gocciole di grasso, si osservano nelle cellule, vacuoli di diversa grandezza, che si distinguono dalle gocce grassose, per una minor rifrangenza e per una tonalità di colore rossastra anzichè giallognola. Se si diluisce il plasma con acqua distillata, le cellule in coltura presentano dopo due o tre giorni, vacuoli le cui dimensioni sono in rapporto diretto col grado della diluizione. L'esperimento dimostra che la formazione di vacuoli è una specie di *infiltrazione idropica.*

Sull'origine delle *cellule giganti*, anche l'osservazione delle colture ha dimostrato che condizione favorevole alla produzione è la presenza di corpi estranei. Attorno ai granuli di licopodio si ammassano cellule e si fondono in elementi polinucleati ameboidi. Nella milza e nel midollo sembrano prodursi spontaneamente simili elementi con 5–200 nuclei: ma anche qui, secondo Lambert, avrebbe importanza lo stimolo estraneo del coprioggetti. Interessantissima l'osservazione diretta del Veratti (1) che nella coltura di polmone, quando, prima di allestire

quest'ultima, furono introdotti bacilli tubercolari nel tessuto polmonare, compaiono cellule gigantesche « con molti nuclei spesso disposti a corona alla periferia attorno ad una zona centrale di protoplasma degenerato ». Non di rado vi si trovano inclusi bacilli e granuli di pigmento. E poichè nelle colture soltanto i fagociti sopravvivono fra le cellule del parenchima polmonare e si notano « tutti gli stadi di passaggio dai fagociti mononucleati, alle forme polinucleate ed alle tipiche forme giganti » così l'A. ritiene poter desumere che almeno una parte delle cellule giganti tubercolari (la cui genesi è tanto discussa) derivi da fagociti istiogeni che nel tessuto vivente si comporterebbero come nelle colture. Nè fu fatto di vedere nei preparati delle colture alcun accenno di fusione dei fagociti fra loro, e ciò deporrebbe a favore della tesi che ammette originarsi le cellule giganti da un elemento unico per successive divisioni del nucleo, mentre il protoplasma rimarrebbe indiviso e solo aumenterebbe di volume. Con ciò – conclude espressamente con grande cautela il Veratti – naturalmente non si esclude che le cellule giganti, anche negli stessi processi tubercolari, si possano formare a spese di altri elementi e con altro meccanismo ».

Tra le molte altre questioni investigate col metodo delle colture, vogliamo ricordare ancora altre due particolarmente interessanti e forse ricche di applicazioni: quella del *simbiotismo* e *parassitismo cellulare*, e della produzione di anticorpi in vitro (cit. da Centanni).

Loeb, Moore e Fleischer iniettando Blastomiceti nella vena auricolare di un coniglio e poi coltivandone il rene, videro che la coltura si sviluppava anche meglio che il rene da solo. Il saccaromicete penetrava nelle cellule fin entro il nucleo, e nel coagulo cresceva in lunghi filamenti. Sembra dunque che il parassita non eserciti altro effetto che il meccanico. Centanni rileva il valore della ricerca e pensa che sarà interessante coltivare i tessuti di predilezione dei *virus filtrabili*, « allo scopo di poter seguire la trasmissione del virus alle successive generazioni di cellule e mettere in vista eventuali strutture che compaiano nelle cellule ».

In tal guisa Noguchi, coltivando tessuto nervoso rabido ha potuto rendere evidenti forme corpuscolari che ha interpretato come parassita della rabbia. Ricerche analoghe ha condotto Centanni sopra la peste aviaria.

L'esperimento di Carrel diretto a dimostrare che le cellule fuori dell'organismo conservano una delle più importanti proprietà biologiche, quella di produrre *anticorpi* specifici, è il seguente: si coltivano in ampie scatole di coltura, – nelle quali è possibile raccogliere il liquido che cola durante lo sviluppo, – frammenti di midollo osseo insieme a glandole linfatiche di cavia, in plasma omogeneo, al quale sono stati aggiunti, come antigene, globuli rossi lavati di capra; si scelgono questi ultimi perchè non sono emolizzati spontaneamente dal plasma di cavia che

serve per la coltura. Il liquido raccolto (cm³ 0,50 – 0.75) al 4°–5° giorno, mescolato in proporzione di due parti con una di sospensione eritrocitica, si vede aver acquistato spiccato potere emolitico sopra i globuli rossi di capra. Emolizza senza aggiunta di complemento; si inattiva a 56° C. e riprende il potere con l'aggiunta di un nuovo complemento: si verifica l'assorbimento elettivo. Tali identità di comportamento inducono a ritenere queste emolisine ottenute dai tessuti in coltura, della stessa natura di quelle che si trovano nel sangue.

Questa esperienza dimostra anche una volta che il fenomeno immunitario dipende strettamente da reazioni cellulari.

Il Lüdke avrebbe ottenuto in maniera analoga agglutinine e batteriolisine. Sono invece incerti i risultati contro antigeni liquidi.

III.

Condizioni di vita dei tessuti in coltura e reazioni per svelare sostanze eterogenee nel siero di sangue.

Se fin qui abbiamo riportato alcune tra le osservazioni più rilevanti ricavate dallo studio diretto del comportamento «in vitro» dei tessuti e degli elementi cellulari coltivati, altrettanto numerose sono le osservazioni che si riferiscono più propriamente allo studio delle condizioni di vita che permettono, favoriscono o inibiscono lo sviluppo dei tessuti in coltura artificiale.

Ma di queste faremo un brevissimo cenno, appartenendo in gran parte alla tecnica delle colture che qui omettiamo: riferiremo cioè ancora soltanto alcuni risultati di interesse biologico generale.

Condizioni indispensabili alla vita degli elementi cellulari in coltura sono quelle della *temperatura* che può oscillare entro certi limiti trovando un optimum fra 38° e 40°, e l'*esclusione* più completa *di batteri*. Sull'influenza della temperatura sono ricche di particolari le esperienze di Lambert e Hanes cui rimandiamo. I tumori sono in coltura, meno resistenti al calore dei tessuti normali.

Per quanto riguarda il *substrato nutritivo* il più impiegato è il plasma sanguigno normale: non è però dimostrato che sia il migliore terreno; anzi alcune esperienze (di Carrel e Burrows con la milza di pulcino) hanno dimostrato che il plasma diluito con due quinti d'acqua permette un accrescimento molto più intenso che il plasma normale, mentre il plasma ipertonico ostacola l'accrescimento: e forse si può pensare che se si riuscisse a trovare per ogni tessuto il mezzo «optimum» in rapporto alla pressione osmotica, si riuscirebbe a evitare nelle colture miste l'azione sopraffacente di un tessuto sull'altro e specialmente del connettivo.

Forse i mezzi liquidi (sol. di Ringer, ecc.) si presterebbero altrettanto bene che il plasma, alla coltura dei tessuti, e W. ed M. Lewis hanno dimostrato che è possibile coltivare frammenti di organi per qualche giorno in acqua di mare e soluzioni saline preparate artificialmente (in questi casi il materiale di nutrizione deriva alle cellule sopravviventi probabilmente dalle cellule distrutte). Senonchè si è visto che un altro elemento indispensabile all'accrescimento è la presenza di un *mezzo di sostegno* solido. Nelle ordinarie colture è rappresentato dal reticolo di fibrina del plasma coagulato; ma può esser sostituito anche da un velo di seta come nelle colture mobili alla Carrel, con quantità relativamente grandi di materiali da coltivare; da fili di cotone, o di altra natura; lo lo stesso coprioggetti offre alla coltura il sostegno necessario quando il plasma si liquefi, come accade talvolta tutt'intorno al frammento innestato avendosi il cosidetto « sviluppo ad anello » descritto da Harrison. Sembra che l'elemento cellulare si trovi in uno « stato di tensione » sopra il suo appoggio (Burrow's) onde la forma appiattita e l'emissione di pseudopodi: se si scuote il preparato, la cellula cade e assume subito la forma rotonda. Oltre ad un ufficio meccanico, Centanni pensa che il sostegno potrebbe esercitare influenze chimiche, nel senso che pel contatto eterogeneo potrebbero svilupparsî nella massa della cellula stessa sostanze stimolatrici all'accrescimento. nel caso della fibrina, poi « si è indotti ad attribuirle un ufficio stimolante di blastina, tenendo presente la grande facilità con cui nell'organismo si organizzano i depositi fibrinosi e, come, un velo di fibrina ricopra le superficie granulanti » [Centanni (1)].

Dei *plasmi* usati i migliori (cioè i più favorevoli all'accrescimento delle colture) sono gli *autogeni* ed omogenei; meno favorevoli gli eterogenei, sebbene tra questi se ne trovino non di rado alcuni abbastanza buoni per lo sviluppo delle colture (Lambert e Hanes): p. es. per il sarcoma di ratto i plasmi di clavia e di topo sono quasi altrettanto buoni terreni quanto il plasma autogene. Nè vi sono criteri (di affinità zoologiche, o di altra natura) per stabilire *a priori* come si comporterà un plasma eterogeneo. Accenniamo, per completezza, all'osservazione che sieri autogeni ed omogenei *riscaldati* per mezz'ora a 56° C. divengono meno favorevoli allo sviluppo dei tessuti in coltura, mentre i sieri eterogenei diventano, con tale trattamento, un mezzo di coltura migliore: perderebbero alcune sostanze termolabili nocive, forse della stessa natura di quelle conosciute nei fenomeni immunitari. Le colture più rigogliose sono destinate prima o poi a perire: dopo quattro o cinque giorni quelle che si riproducono più attivamente, dopo un tempo più lungo (sino ad un mese) quelle a più torpido sviluppo. Ciò sarebbe dovuto all'accumularsi dei prodotti tossici del ricambio degli elementi rimasti in vita: all'esaurimento del materiale nutritizio nel plasma; e – come vuole il Veratti –

anche ai prodotti di autolisi del tessuto che cade in necrosi che agiscono pure come sostanze tossiche sugli altri elementi sopravviventi della coltura.

Eliminando (almeno in parte) questi fattori si può prolungare la vita degli elementi in coltura, teoricamente, all'infinito. Ciò ha ottenuto il Carrel con l'introduzione del *rinnovamento della coltura* cioè col trapianto dei frammenti dell'antica coltura, previo lavaggio in liquidi adatti (Ringer), in nuovo plasma fresco.

Stabilite le condizioni migliori per lo sviluppo di un tessuto o di un elemento cellulare in coltura, è chiaro che nelle deviazioni di questo sotto l'influenza di *agenti fisici o chimici*, abbiamo la miglior misura dell'azione da questi esercitata sopra le cellule. Ciò può farsi o mescolando la sostanza chimica da esperimentare al plasma della coltura, o affrontando ai frammenti dei tessuti altri frammenti di tessuto o tubi capillari di vetro di Pfeffer contenenti sostanze diverse.

Si è constatata, in linea generale, un'influenza degli estratti di tessuti (specialmente embrionali) aggiunti al plasma, favorevole allo sviluppo delle colture. Invece la ricina e la tossina difterica impediscono l'accrescimento delle colture (Levaditi e Mutermilch): il siero antidifterico eserciterebbe anche in questo caso la sua azione curativa.

Tessuti di cavia sottoposta a narcosi cloroformica sono inibiti nello sviluppo nella coltura in vitro, ad eccezione del fegato, che da una cloronarcosi leggiera viene stimolato alla proliferazione: una cloronarcosi intensa o mortale inibisce lo sviluppo di tutti i tessuti (Gironi).

Con le *colture di tessuti affrontati*, con tecnica perfezionata ed elevata a metodo specialmente dal Centanni (2), risulta che, che in generale, tessuti dello stesso animale esercitano blastotropismo positivo, cioè v'è maggior intensità di accrescimento al polo frontale rivolto verso un altro tessuto affrontato; solo la capsula surrenale, e l'adrenalina, esercitano un blastotropismo negativo (Centanni, Ugurgieri, Sanguineti): « la vegetazione avviene solo dalla parte opposta all'affrontata, o se si verifica in questa, si rivolge indietro a foggia di uncino » (Centanni). Le sostanze nervine (stricnina, caffeina, cloralio) saggiate con i capillari di Pfeffer, attivano la proliferazione dei tessuti; il cloralio specialmente favorisce l'accrescimento dei tronchi nervosi (Sanguineti) e in due casi ha determinato una trasformazione maligna dei teratoidi (Askanazy); i prodotti di autolisi di blastomiceti esercitano azione favorevole di blastotropismo positivo; quelli del B. coli appaiono piuttosto inibitori (Fiori).

Il metodo della coltura dei tessuti ci ha fornito infine un mezzo nuovo per rilevare « in vitro », – come finora era possibile soltanto per le emolisine – la presenza di sostanze citotossiche o citolitiche (citotossine) nel siero di animali trattati (plasmi immuni). Il metodo è stato utilizzato da Lambert e Hanes i quali hanno constatato che il plasma

di un animale, al quale siano state praticate inizioni di un tessuto estraneo, diviene un mezzo di coltura inadatto per questo tessuto. Così videro che adoperando come substrato, per la coltivazione di un sarcoma del ratto, il plasma di cavie alle quali era stata inoculata poltiglia di sarcoma di ratto, fegato, e sangue defibrinato, il sarcoma non si sviluppava affatto se il plasma proveniva da cavie inoculate con poltiglia di sarcoma, e si sviluppava soltanto in misura scarsissima se il plasma proveniva da cavie inoculate con sangue defibrinato di ratto.

Gli AA. aggiungono che (poichè non si ha soltanto, in questi plasmi immuni, un arresto dello sviluppo, ma bensì una rapida distruzione delle cellule in coltura) sia da ritenersi che questi anticorpi siano di natura tossica. Sulla questione della specificità o meno degli anticorpi in parola, gli AA. dichiarano le loro esperienze inadeguate a risolvere il quesito, ma pensano che esperienze analoghe potranno chiarire questo punto.

Analogamente Foot trovò che, inoculando il coniglio con midollo osseo di pollo, questo non si sviluppa nel plasma del coniglio trattato, e si manifestano inoltre fenomeni di precipitazione e di necrosi nel tessuto innestato.

Infine Lambert e Hanes si servirono del metodo della coltura in vitro per portare un nuovo contributo alla conoscenza della cosidetta *immunità tumorale*. Il metodo può servire assai bene, secondo gli AA., a controllare la importanza di svariati fattori che hanno parte nella riuscita o meno del trapianto delle cellule neoplastiche, quali la formazione dello stroma, la vascolarizzazione, le reazioni cellulari, la fagocitosi e così via. L. e H. sperimentarono la coltura di sarcoma di ratto (del Laboratorio di Ehrlich) in plasma di sei tipi differenti di ratti naturalmente immuni, e constatarono che lo sviluppo si verifica altrettanto bene che in plasmi normali e di animali recettivi al tumore. I frammenti di tumore coltivato, attecchiscono inoltre con virulenza non diminuita in nuovi trapianti in vivo su ratti recettivi. Nelle colture non si osservano, dopo tre giorni a 37°, fenomeni degenerativi. Si può concludere da queste esperienze che *l'immunità verso i tumori non è di natura umorale*, cioè non è dovuta alla presenza di anticorpi citotossici o citolitici nei succhi degli animali refrattari. Questi risultati valgono come una conferma e una riprova di osservazioni di altri AA; che riferivano già alla mancante capacità di formare uno stroma (e non a una sieroimmunità) il non attecchimento del cancro dei topi nei topi refrattari, formazione dello stroma che si verifica invece nei topi recettivi (Russel).

IV.

Cenni sulla coltura dei tumori.

Chiudiamo questa rassegna accennando alla *coltura dei tumori maligni* che fu praticata con successo da Carrel e Burrows per vari tumori umani (sarcoma della tibia, carcinoma della mammella, cancro del labbro), da Volpino e da Lambert e Hanes pei tumori trasmissibili dei topi e dei ratti, da Maccabruni pel carninoma uterino, dal Veratti per un adenocarcinoma del cane, e da altri.

La proliferazione delle cellule neoplastiche in coltura non differisce da quella dei tessuti normali, ma l'accrescimento è più rapido e domina la forma ameboide. Nei tumori misti si moltiplicano con uguale intensità gli elementi epiteliali e connettivali di sostegno, a differenza di quanto si verifica nei tessuti adulti normali, «nei quali solo il connettivo sopravvive e prolifera» [Veratti (2)].

Ai movimenti ameboidi vivaci nelle cellule neoplastiche in coltura, Lambert e Hanes, danno particolare risalto per l'importanza che potrebbero avere in vivo nella invasione dei tessuti normali, e nel fenomeno della metastasi.

Già abbiamo ricordato come appunto nelle colture dei tumori furono rilevate quelle forme atipiche di mitosi, che, da alcuni AA. (Heidenhain) sono state citate come un elemento di importanza probativa nella diagnosi di un tessuto sospettato neoplastico.

Ma ciò che controddistingue la coltura dei tumori da quella dei tessuti sani è la breve durata di vita dei primi. Così a Carrel, come a Lambert non riuscì di impedire che il tumore si estinguesse a un dato momento, senza causa apparente. Sarebbe della maggiore importanza, - perchè risolverebbe un punto dei più importanti sulla essenza della natura neoplastica, - poter stabilire, come fa rilevare il Centanni, se queste interruzioni siano da ripetersi dalla necessità che avrebbero i tumori di esser sostenuti dal ricambio dell'intero organismo (secrezioni interne ?), - oppure se dette interruzioni siano imputabili a deficenze non ancora determinate nella tecnica delle colture.

La difficoltà di mantenere in vita, oltre un certo numero di passaggi, le masse di cellule tumorali, ha riscontro del resto in quelle che abbiamo già visto esistere per mantenere, a tessuti normali altamente differenziati, la capacità moltiplicativa (accrescimento in vitro). Questa - nota ancora il Centanni - è sulla stessa linea delle attività funzionali che si è riusciti a mantenere fino a oggi, coi nostri mezzi artificiali, a quasi tutti i tessuti coltivati : attività funzionali che con le manifestazioni motorie, secretive e di eccitabilità ci danno la miglior misura della sopravvivenza dei tessuti in vitro.

Per mantenere a tutti i tessuti isolati dall'organismo le loro attività riproduttrici, occorrerà forse soltanto un ulteriore perfezionamento nella tecnica dei mezzi artificiali di coltura per soddisfare alle esigenze di un ricambio cellulare tanto più complesso, quale è quello che deve essere a base di quelle attività.

Ad ogni modo i fenomeni della sopravvivenza (sia di elementi cellulari isolati, sia di organi interi) che erano noti già da lungo tempo, e i tentativi fatti in quel senso, possono considerarsi a buon diritto i precursori del metodo della " coltura „ propriamente detta dei tessuti animali: metodo che ha preso posto nella scienza soltanto in un'epoca relativamente assai recente (1907), che ha dato già larga messe di risultati, e più promette di darne con i perfezionamenti che potranno essere introdotti nella tecnica delle colture; cioè in quelle svariate, molteplici e delicatissime condizioni che noi saremo in grado di apprestare alla materia vivente sottoposta all'indagine, onde mantenere ad essa la vita.

Dott. GAETANO BOMPIANI.

Assistente nell'Istituto di Anatomia patologica della R. Università di Roma.

LAVORI CITATI

E AI QUALI SI È ATTINTO MAGGIORMENTE NELLA COMPILAZIONE DELLA PRESENTE RASSEGNA.

1. CENTANNI, *La coltura dei tessuti «in vitro»*, «Monografie di Biologia chimica», n. 1, 1914. (Vi è riferita per esteso la letteratura).

2. — *Sulle colture affrontate dei tessuti «in vitro» nello studio della polarità di accrescimento.* Pathologica, 1914.

3. LAMBERT e HANES, *Beobachtungen an Gewebskulturen «in vitro»*, Virchow's Archiv., vol. 211, 1913.

4. LEVI GIUSEPPE, *La vita degli elementi isolati dall'organismo.* Scientia, 1, I, 1919.

5. — *La costituzione del protoplasma studiata su cellule viventi coltivate «in vitro».* Archivio di Fisiologia, 1916, vol. 14, pag. 101.

6. — *Considerazioni sulla costituzione fisica del citoplasma desunti da nuovi dati morfologici sulle cellule coltivate «in vitro».* Rendic. Acc. Lincei, Classe scienze fisiche, matematiche e naturali, pag. 136, 1918.

7. MACCABRUNI, *Esperienze di coltivazione «in vitro» del cancro uterino umano.* Annali ostetricia e ginecologia, vol. 36, pag. 57, 1914.

8. VERATTI, *Ricerche istologiche su alcuni tessuti in stato di sopravvivenza «in vitro».* Boll. Soc. Med. Pavia, n. 1-2, 1919.

9. — *Contributo allo studio delle colture dei tumori maligni «in vitro».* Boll. Soc. Med. Pavia, n. 1-2, 1919.

10. VOLPINO, *Tentativi di coltura dei tumori.* Atti Acc. Med. Torino, 1910.
